

# COMPETITIVIDADE DE ESTIRPES PERTENCENTES A DIFERENTES ESPÉCIES DE RIZÓBIO PARA OCUPAÇÃO NODULAR EM FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)

MARCELO FRANCISCO MENDES DE SOUZA<sup>1</sup>; HELSON MÁRIO MARTINS DO VALE<sup>2</sup> & ROSÂNGELA STRALIOOTTO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Discente do Curso de Agronomia, UFRRJ, Rio de Janeiro-RJ, Bolsista de IC/FAPERJ Embrapa Agrobiologia; <sup>2</sup>Mestrando em Microbiologia Agrícola, UFLA, Lavras- MG; <sup>3</sup>Pesquisadora Embrapa Agrobiologia, Seropédica- RJ.

## RESUMO

O gênero *Sinorhizobium* foi recentemente descrito como capaz de nodular e fixar nitrogênio eficientemente em feijoeiro. Foi estudada a competitividade destas estirpes pela ocupação nodular, comparando-se as estirpes de *R. tropici* recomendadas no inoculante comercial (BR322 e BR520) com estirpes de *Sinorhizobium* sp. Estirpes de *Sinorhizobium* sp. mostraram-se eficientes na fixação biológica de nitrogênio, apresentando acúmulo de matéria seca e nitrogênio na parte aérea semelhantes a testemunha nitrogenada e superiores a estirpe BR322. A estirpe BR923 foi mais competitiva do que as estirpes do inoculante comercial, sendo que as demais estirpes de *Sinorhizobium* foram tão competitivas quanto a estirpe BR520.

**Palavras-chave:** Feijão, Fixação Biológica de Nitrogênio, Rizóbio, Competição de estirpes.

## ABSTRACT

### EVALUATION OF RHIZOBIAL STRAIN COMPETITIVENESS FOR NODULE OCCUPATION ON COMMON BEANS (*Phaseolus vulgaris* L.)

The capacity to nodulate and efficiently fix nitrogen in association with common bean was recently described for *Sinorhizobium* sp. strains. The competition for nodule occupancy among these strains and the commercial inoculant, produced with *Rhizobium tropici* strains (BR322 e BR520), was investigated. *Sinorhizobium* strains were more efficient in nitrogen fixation, accumulating values of shoot dry matter and nitrogen similar to plants receiving mineral nitrogen and higher than plants inoculate with strain BR322. Strain BR923 of *Sinorhizobium* was the most competitive, and the other strains from this genera were as competitive as strain BR520.

**Key words:** common bean, competitiveness, nitrogen fixation, nodulation, rhizobia

## INTRODUÇÃO

A introdução de estirpes de rizóbio pelo processo de inoculação das sementes poderá resultar na formação de poucos nódulos na leguminosa hospedeira devido a competitividade com outras estirpes presentes no solo (Weaver & Frederick, 1974; Oliveira & Vidor, 1984; Vidor *et al.*, 1988). Essas condições podem estar relacionadas com a habilidade intrínseca da estirpe em competir por sítios de nódulos (Skrdleta & Karimova, 1969; Vidor *et al.*, 1979; Oliveira, 1982; Pereira, 1983), com a concentração de células do rizóbio no inoculante e na rizosfera do hospedeiro (Weaver & Frederick, 1974; Peres & Vidor, 1980; Vidor & Oliveira, 1982) e com fatores ambientais que atuam de forma seletiva sobre as estirpes de rizóbio (Vidor *et al.*, 1986). A promiscuidade do feijoeiro em relação a nodulação pelo rizóbio é uma das

principais dificuldades no estabelecimento das estirpes inoculadas em condições de campo.

O feijoeiro é considerado um hospedeiro promíscuo, ou seja, uma grande diversidade de espécies são capazes de formar associações de eficiência variável com esta planta. A taxonomia do rizóbio de feijoeiro apresentou uma grande evolução nos últimos anos, sendo que atualmente pelo menos cinco espécies distintas são reconhecidas como simbiontes desta planta, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Jordan, 1984); *R. tropici* (Martínez-Romero *et al.*, 1991); *R. etli* (Segovia *et al.*, 1993); *R. gallicum* e *R. giardinii* (Amarger *et al.*, 1997). Além destas, um grande número de isolados classificados como *Sinorhizobium* sp. foi recuperado de nódulos de feijoeiro em solos tropicais brasileiros (Straliotto *et al.*, 1997).

Como resultado desses estudos de diversidade,

percebeu-se a inadequação às condições tropicais do rizóbio que vinha tradicionalmente sendo recomendado como inoculante para o feijoeiro. A maioria daqueles isolados pertencia ao anteriormente chamado grupo de estirpes do tipo I, que engloba as espécies *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. etli*. Estudos das suas características genéticas mostraram que estas espécies estão sujeitas a um elevado grau de instabilidade genética, ou seja, podem, com o tempo perder a capacidade de fixar nitrogênio no feijoeiro. Por outro lado, a espécie *R. tropici* (Martínez-Romero *et al.*, 1991), capaz de nodular feijoeiro, a leucena e diversas outras leguminosas, mostrou uma maior estabilidade nas suas características culturais e de nodulação após prolongados períodos de estocagem, além de demonstrarem boa adaptação a solos ácidos e maior tolerância a temperaturas elevadas. A recuperação de rizóbio do solo utilizando a leucena como planta isca tem sido eficiente na recuperação de isolados, com maior eficiência em feijoeiro, pertencentes a pelo menos dois grupos taxonômicos distintos, *R. tropici* (Mercante *et al.*, 1998) e *Sinorhizobium* sp. (Straliotto, 1999) os quais vem sendo testados em condições de campo visando a produção de um inoculante mais eficiente para o feijoeiro.

Uma das características importantes na seleção de estirpes de rizóbio mais eficientes é a sua competitividade, ou seja, a sua capacidade de formar a maioria dos nódulos da planta, superando as estirpes de rizóbio nativas, de baixa eficiência. Muitos estudos de competitividade visando comparar estirpes de *R. tropici* com outras espécies de rizóbio que nodulam o feijoeiro tem sido conduzidos, devido ao interesse levantado em torno das características de tolerância a acidez e altas temperaturas desta espécie. Martínez & Rosenblueth (1990) inicialmente estabeleceram que esta espécie seria menos competitiva do que as demais estirpes do tipo I, o que justificaria a pouca presença de isolados pertencentes à esta espécie nas coleções de culturas analisadas pelos autores. No entanto, experimentos posteriores conduzidos por Straliotto *et al.* (1991), Straliotto e Franco, (1993) mostraram que estirpes classificadas como *R. tropici*, inclusive o isolado original da CIAT 899, são mais competitivas do que as do tipo I. Atualmente, o inoculante comercial produzido para o feijoeiro no Brasil contém duas estirpes de *R. tropici* (BR322 e BR520), espécie considerada adaptada aos solos tropicais, pelas características acima citadas de tolerância a altas temperaturas, acidez do solo e competitividade. Os resultados obtidos em condições de campo tem demonstrado que a estirpe CIAT 899 (BR322) apresenta uma baixa sobrevivência no solo após cultivos sucessivos do feijoeiro (Vlassak *et al.*, 1996), o que evidencia a necessidade de reinoculação a cada plantio.

Este trabalho teve por objetivo avaliar estirpes pertencentes às espécies *Sinorhizobium* sp e *Rhizobium tropici* quanto a eficiência simbiótica e capacidade competitiva na cultivar Carioca 80.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em lampadário na Embrapa Agrobiologia, sob condições controladas de temperatura e iluminação. As estirpes de rizóbio utilizadas foram BR322, BR520 de *R. tropici* e BR531, BR532, BR868 e BR923 de *Sinorhizobium* sp. pertencentes a Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia. As estirpes de rizóbio foram crescidas em meio YMA (Vincent, 1970) a 29°C, por três dias, sob agitação. Inicialmente foi estabelecida a relação entre a densidade ótica (DO), medida a 560nm, em espectrofotômetro, e o número de unidades formadoras de colônia (ufc), para cada estirpe. Desta maneira foi possível estabelecer a DO correspondente a 10<sup>8</sup> ufc/mL, permitindo o ajuste da concentração de células das estirpes previamente ao procedimento de inoculação. Antes do plantio, as sementes de feijoeiro da cultivar Carioca 80 foram esterilizadas por 30 segundos em álcool, três minutos em peróxido de hidrogênio P.A, seguidos por dez lavagens com água destilada esterilizada. No momento do plantio adicionou-se 1 mL de inoculante (com cerca de 10<sup>8</sup> células/mL) a cada semente, cobrindo-se então, com uma camada de aproximadamente 1 cm de areia esterilizada. As plantas cresceram em vasos de Leonard modificados (Vincent, 1970) contendo areia e vermiculita (1:2 V:V), esterilizados em autoclave a 120°C, por uma hora. Foram semeadas quatro sementes por vaso, procedendo-se o desbaste, aos oito dias após a emergência (DAE), deixando-se duas plantas por vaso. Semanalmente procedeu-se a adubação dos vasos com solução nutritiva de Norris (Norris & T'Mannetje, 1964), isenta de nitrogênio, exceto para o tratamento das testemunhas nitrogenadas. Este tratamento recebeu 10, 15, e 20 mg de N/planta, na forma de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, respectivamente na primeira, segunda e subseqüentes semanas após o plantio, num total de 65 mg N/planta. O delineamento experimental usado foi em blocos ao acaso com quatro repetições, dezessete tratamentos, totalizando 68 vasos e a coleta foi feita 30 DAE. Os tratamentos de inoculação consistiram da inoculação de cada uma das estirpes utilizadas isoladamente e da competição de cada uma das estirpes de *Sinorhizobium* sp. com as estirpes comerciais. Os tratamentos foram assim identificados: 1) BR868, 2) BR531, 3) BR532, 4) BR923, 5) BR520, 6) BR322, 7) BR520 X BR868, 8) BR520 X BR531, 9) BR520 X BR532, 10) BR520 X BR923, 11) BR322 X BR868, 12) BR322 X BR531, 13) BR322 X BR532, 14) BR322 X BR923, 15) BR322 X BR520. Como tratamentos adicionais foram incluídos: 16) testemunha absoluta (sem inoculação e sem adição de nitrogênio) e 17) testemunha nitrogenada (sem inoculação e com adição de nitrogênio mineral).

Os parâmetros avaliados foram: acúmulo de matéria seca e nitrogênio na parte aérea, número e peso de nódulos e a porcentagem de ocupação nodular. Para determinação do acúmulo de matéria seca e nitrogênio, a parte aérea, cortada na altura do nó cotiledonar, foi seca em estufa a 65°C, até atingir um peso constante. O nitrogênio na parte aérea foi avaliado conforme descrito

em Silva (1999). A capacidade competitiva das diferentes estirpes foi avaliada pela diferença em sua resistência natural a antibióticos. Inicialmente testou-se a resistência natural aos antibióticos: streptomina, rifampicina, espectinomicina, cloromphenicol, gentamicina e canamicina, selecionando níveis de resistência contrastantes que pudessem identificar a ocupação nodular por cada uma das estirpes competidoras (Vale *et al.*, 2001). No momento da coleta, as raízes foram lavadas e os nódulos foram destacados e colocados em dessecador contendo sílica-gel para desidratação e preservação até o momento do isolamento do rizóbio. Selecionou-se 20 nódulos de cada repetição, os quais foram reidratados em água destilada esterilizada, procedendo-se então a desinfestação superficial segundo Vincent (1970). O rizóbio foi isolado em placas com meio YMA contendo vermelho Congo como indicador, para facilitar a identificação de colônias contaminantes. O rizóbio isolado de cada nódulo foi transferido com palito de dente esterilizado para placas de meio YMA contendo os antibióticos na concentração determinada para a identificação. A estirpe BR 520 foi identificada na competição com a estirpe BR868, BR531, BR532 e BR923 pela sua resistência aos antibióticos streptomina e canamicina na concentração de 100 µg/mL, a cujas concentrações as demais estirpes são sensíveis. A estirpe BR322 foi identificada na competição com estas mesmas estirpes pela sua resistência aos antibióticos streptomina e cloromphenicol na concentração de 100 µg/mL, a cujas concentrações as demais estirpes são sensíveis. As estirpes BR 322 e BR 520 foram distintas pela resistência natural da estirpe BR 322 a cloromphenicol em concentração de 100 µg/mL e pela resistência natural da estirpe BR 520 a canamicina em concentração de 60 µg/mL.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Tabela 1 estão apresentados os dados de nodulação, onde observa-se que, de modo geral, as plantas inoculadas com todas as estirpes apresentaram uma excelente nodulação, com uma média de 162 nódulos/planta e um peso de 89mg de nódulos/planta. Além disso, observa-se na mesma tabela, que houve maior nodulação nos tratamentos de competição com a estirpe BR 322, os quais não diferiram estatisticamente do tratamento inoculado com a estirpe BR 322 isoladamente. Quanto ao peso de nódulos, observa-se que as estirpes BR 531 e BR 322, apesar de induzirem a formação de um maior número de nódulos do que a maioria das demais estirpes, estes apresentaram massa nodular estatisticamente inferior a dos demais tratamentos. Não houve nodulação nas plantas dos tratamentos testemunha nitrogenada e testemunha absoluta, indicando uma boa esterilização do substrato e assepsia na condução do experimento.

Os dados de produção de matéria seca da parte aérea

(Tabela 1) mostram que a maioria das estirpes de *Sinorhizobium* sp. foram eficientes na fixação biológica de nitrogênio (FBN), acumulando valores estatisticamente semelhantes a testemunha nitrogenada. Por outro lado, a estirpe BR 531 de *Sinorhizobium* sp e BR 322 de *Rhizobium tropici*, apesar de induzirem a formação de maior número de nódulos, não foram eficientes na produção de matéria da parte aérea. O acúmulo de nitrogênio na parte aérea (Tabela 1) seguiu a mesma tendência.

Os resultados do quadro de percentagem de ocupação nodular (Tabela 2) mostram que a maioria das estirpes de *Sinorhizobium* (BR531, BR532 e BR868) foram menos competitivas do que a estirpe BR322, do inoculante comercial, porém todas foram mais competitiva que a estirpe BR520 também recomendada atualmente para inoculação de feijoeiro. A estirpe BR923 (*Sinorhizobium* sp.) destacou-se sendo mais competitiva entre todas as estirpes testadas.

**Tabela 1-** Número (NN) e peso de nódulos (PN), produção de matéria seca (PMSPA) e nitrogênio total da parte aérea (NTPA) de feijoeiro cv Carioca 80, inoculado com estirpes de rizóbio, isoladamente ou em competição (inoculadas na proporção 1:1). Experimento coletado aos 30 DAE. Dados são médias de 4 repetições. Colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott a 5%.

ESTIRPES	NN	PN (mg.pl <sup>-1</sup> )	PPAS (mg.pl <sup>-1</sup> )	NTPA (mg.pl <sup>-1</sup> )
BR868	117b	105.2a	723.5a	26.9a
BR531	117a	81.5b	515.5b	14.5b
BR532	147b	119.2a	665.6a	21.9a
BR923	95b	109.2a	690.5a	24.6a
BR520	120b	103.7a	734.5a	26.8a
BR322	195a	48.7b	343.5b	8.5c
BR520XBR868	137b	98.7a	584.2b	22.6a
BR520XBR531	152b	94a	496.2b	16.4b
BR520XBR532	112b	83.7a	642.6a	24.3a
BR520XBR923	119b	96.2a	586.2b	22.9a
BR322XBR868	204a	64b	433.6b	10.9b
BR322XBR531	217a	66.5b	441.1b	11.8b
BR322XBR532	246a	92.5a	568.1b	14.4b
BR322XBR923	192a	66b	548.6b	14.9b
BR322XBR520	208a	105.8a	529.1b	17.5b
T. A.			239.3b	3.1c
T. N.			626.5a	26.1a

**Tabela 2-** Porcentagem de ocupação nodular das estirpes competidoras. Experimento coletado aos 30 DAE. Dados são médias de 4 repetições. Dados seguidos pela mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott a 5%.

Tratamentos de competição	% Ocupação Nodular	
	Estirpe A	Estirpe B
BR 520 (A) x BR 868 (B)	37,50 a	62,50 a
BR 520 (A) x BR 531 (B)	40,00 a	60,00 a
BR 520 (A) x BR 532 (B)	41,25 a	58,75 a
BR 520 (A) x BR 923 (B)	38,75 b	61,25 a
BR 322 (A) x BR 868 (B)	71,25 a	28,75 b
BR 322 (A) x BR 531 (B)	67,50 a	32,50 a
BR 322 (A) x BR 532 (B)	58,75 a	41,25 b
BR 322 (A) x BR 923 (B)	38,75 b	61,25 a
BR 322 (A) x BR 520 (B)	68,75 a	31,25 a

## CONCLUSÃO

As estirpes BR923, BR532, BR868 de *Sinorhizobium* sp. mostraram-se eficientes na fixação biológica de nitrogênio, apresentando valores de acúmulo de matéria seca e nitrogênio na parte aérea semelhantes a testemunha nitrogenada e superiores a estirpe BR322. Quanto a ocupação nodular, a estirpe BR923 foi mais competitiva do que as estirpes do inoculante comercial BR322 e BR520. Além disso, as estirpes BR868, BR531 e BR532 de *Sinorhizobium* sp. foram tão competitivas quanto a estirpe BR520. Os dados obtidos neste experimento indicam um bom potencial deste grupo genotípico de rizóbio para inoculação do feijoeiro, sendo que, juntamente com dados de experimentos de campo que estão sendo acumulados por este grupo de pesquisa, subsidiarão a recomendação da estirpe BR 923 para a produção de inoculante comercial no Brasil.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 47, p. 996-1006. 1997.
- JORDAN, D.C. Family III Rhizobiaceae. CONN. 1938. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G., eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams, 1984.

p.234-256.

- MARTINEZ-ROMERO, E.; ROSENBLUETH, M. Increased bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulation competitiveness of genetically modified *Rhizobium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.56, p.2384-2388,1990.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, E.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.H & PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.41, p. 417-426. 1991.
- MERCANTE, F. M.; CUNHA, C. O.; STARLIOTTO, R.; RIBEIRO-JUNIOR, W. Q.; VANDERLEYDEN, J.; FRANCO, A.A. *Leucaena leucocephala* as a trap-host for *Rhizobium tropici* strains from the Brazilian "Cerrado" region. *Revista de Microbiologia*, v. 29, p.49-58. 1998.
- NORRIS, D.O.; T'MANNETJE, L. The symbiotic specialization of African *Trifolium* spp. In relation to their taxonomy and their agronomic use. *East African Agricultural and Forestry Journal*, Nairobi, v. 29, p. 214-235, 1964.
- OLIVEIRA, L. A & VIDOR, C. Colonização, sobrevivência e competitividade de estirpes de *Rhizobium japonicum*. *Revista bras. Ciência do Solo*, Campinas, v.8, p.57-62, 1984.
- OLIVEIRA, L. A. Eficiência, capacidade competitiva e sobrevivência de estirpes de *Rhizobium japonicum*. (Kirchner) Buchanan. Porto Alegre, UFRGS. Faculdade de Agronomia, 1982. 143p. (Dissertação de Mestrado).
- PEREIRA, J. C. Obtenção e avaliação de mutantes espontâneos de *Rhizobium phaseoli* resistentes a antibióticos e fungicida. Porto Alegre, UFRGS, Faculdade de Agronomia, 1983. 88p. (Dissertação de Mestrado).
- PERES, J. R. R. & VIDOR, C. Relação entre concentração de células no inoculante e competição por sítios de infecção nodular entre estirpes de *Rhizobium japonicum* em soja. *Revista bras. Ciência do Solo*, Campinas, v. 4, p.139-143, 1980.
- SEGOVIA, L.; YOUNG, J.P.W.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of american *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 43, p.374-377. 1993.
- SILVA, F. C. da. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Embrapa Solos, Embrapa

- Informática Agropecuária; organizador Fábio Cesar da Silva, Brasília: Embrapa Comunicação para transferência de Tecnologia, 370p. 1999.
- SKRDLETA, V. & KARIMOVA, J. Competition between two somatic serotypes of *Rhizobium japonicum* used as double-strain inocula in varying proportions. *Arch. Microbiol.*, Berlin, v. 66, p.25-28, 1969.
- STRALIOTTO, R. Diversidade fenotípica e genotípica do rizóbio que nodula o feijoeiro em solos tropicais brasileiros. 1999. 168p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- STRALIOTTO, R.; CUNHA, C. O.; FERREIRA, M. E.; RUMJANEK, N.G. Diversidade genética do rizóbio que nodula o feijoeiro em regiões tropicais: *Sinorhizobium*, um novo gênero nodulando eficientemente o feijoeiro em condições de estresse térmico. In: XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia, 11-15 de novembro de 1997. Resumos... Rio de Janeiro, Brasil. Sociedade Brasileira de microbiologia, 1997.
- STRALIOTTO, R.; FRANCO, A. A. Competitividade entre estirpes de *Rhizobium tropici* e *R. leguminosarum* bv. phaseoli e uso de mutante glucuronidase positivos. In: XXIV Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 24, Goiânia, GO, 1993. Resumos...Goiânia, sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1993.
- STRALIOTTO, R.; YUNDA, A.L.; FRANCO, A.A.; BALDANI, J.I. Estirpes de rizóbio do tipo II tolerantes a altas temperaturas e competitivas para inoculação do feijoeiro. In: FEIRA NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA, 2, 1991, São Paulo, Resumos... São Paulo: Associação Brasileira de Empresas de Biotecnologia, 1991, p. 17.
- VALE, H. M. M. do; STRALIOTTO, R.; PEREIRA, J. C.. Resistência natural de estirpes de rizóbio que nodulam o feijoeiro a metabólitos produzidos por actinomicetos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 28., jul. 2001, Londrina. Ciência do solo: Fator de produtividade competitiva com sustentabilidade. Resumos... Londrina: Embrapa Soja, 2001. p.72.
- VIDOR, C. & OLIVEIRA, L.A. Importância da capacidade competitiva de estirpes de *Rhizobium japonicum* na produtividade de soja. IPAGRO Informa, Porto Alegre, v. 25, p.55-64, 1982.
- VIDOR, C.; BROSE, E. & PEREIRA, J.S. Competição por sítios de infecção nodular entre estirpes de *Rhizobium japonicum* em cultivares de soja. *Agron. Sulriorg.*, Porto Alegre, v. 15, p.227-238, 1979.
- VIDOR, C.; MENDES, N.G & PEREIRA, J.S. Seleção de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv phaseoli em feijão. In: REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DO FEIJÃO E OUTRAS LEGUMINOSAS DE GÃOS ALIMENTÍCIOS, 21., Porto alegre, 1988. Instituto de Pesquisas Agronômicas, 1988. P. 65-67.
- VIDOR, C.; OLIVEIRA, L.A. & LOVATO, P.E. Sobrevivência e competição de estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. In: REUNIÃO LATINO-AMERICANA DE RHIZOBIUM, 13., Panamá, 1986. Universidade de Panamá, 1986. P.247-299.
- VINCENT, J.M. Manual for the practical study of root nodule bacteria. London, *International Biological Programme*, IBP Handbook, 164p. 1970.
- VLASSAK, K.; VANDERLEYDEN, J.; FRANCO, A.A. Competition and persistence of *Rhizobium tropici* and *Rhizobium etli* in a tropical soil during successive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultures. *Biology and Fertility of Soils*, v. 21, p.61-68. 1996.
- WEAVER, R.W. & FREDERICK, L.R. Effect of inoculum rate competitive nodulation of *Glycine max* (L.). Merrill.II. *Field studies. Agron. J.*, Medison, v. 66, p.233-236, 1974.